

Wykorzystanie chromatografii gazowej oraz cieczowej w analizie wybranych parametrów fizjologiczno-biochemicznych roślin

Sara Nawrocka

Koło Naukowe „BIO-TECH”

Pozawydziałowy Zamiejscowy Instytut Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych

Uniwersytet Rzeszowski

nawrocka.nawrocka@gmail.com

Praca napisana pod opieką dr Magdaleny Duda

Chromatografia gazowa oraz cieczowa z powodzeniem są wykorzystywane w analizie fizjologicznej oraz biochemicznej roślin. Wybór procedury badawczej i techniki rozdzielania zależy od rodzaju badanego materiału roślinnego. Oba rodzaje omawianych w pracy technik dają szeroki wachlarz możliwości w aspekcie rozdzielania składowych mieszanin związków lotnych, stałych lub cieczy. Pozwala to na dokładniejsze poznanie ich budowy, a w konsekwencji możliwości przypisania im nowych, wcześniej niepoznanych właściwości.

W pracy przedstawiono wybrane aspekty zastosowania chromatografii gazowej i cieczowej w analizie podstawowych parametrów fizjologiczno-biochemicznych wpływających na wzrost, rozwój i plonowanie roślin.

Wstęp

Charakteryzując procesy biochemiczne, biofizyczne i fizjologiczne w roślinach warto zwrócić uwagę na transpirację (proces biofizyczny), metabolizm komórkowy, w tym fotosyntezę (procesy biochemiczne), całkowitą ilość chlorofilu znajdującą się w nadziemnych częściach rośliny, poziom kwasu askorbinowego oraz rozpuszczalnych cukrów, przekładające się na wzrost i prawidłowe funkcjonowanie roślin. Dane literaturowe wskazują na zainteresowanie badaczy analizą procesów metabolicznych i komponentów w nie zaangażowanych, a także gazów uczestniczących w przemianach fizjologicznych oraz fi-

tohormonów [1, 3]. Co więcej ostatnie lata wskazują na intensywny rozwój metod analitycznych, które warunkują precyzyjną i kompleksową analizę całego spektrum związków występujących w badanej matrycy. Dążenie do oznaczania największej liczby związków chemicznych na coraz niższym poziomie stężeń w coraz bardziej złożonych matrycach i coraz krótszym czasie pociąga za sobą konieczność zoptymalizowania procedury badawczej, także w kierunku jak najmniejszej ilości wykorzystywanego materiału badanego. Podstawą sukcesu oznaczenia ilościowego i jakościowego danego komponentu na niskim poziomie stę-

żeń są z całą pewnością metody pobierania próbek oraz zastosowane techniki analityczne [13, 14].

Najczęściej wykorzystywanymi metodami instrumentalnymi są między innymi techniki chromatograficzne, spektrofotometryczne i spektrometryczne (m.in. atomowa spektrometria absorpcyjna ASA) [1]. W pracy przedstawiono przykłady zastosowania chromatografii gazowej i cieczowej w wybranych obszarach analizy roślin. System chromatografii gazowej (GC) i cieczowej (LC) składa się z kilku podstawowych elementów: układu dozowania, termostatu, kolumny chromatograficznej, detektora oraz rejestratora otrzymanych wyników. W GC wykorzystywany jest on do dokładnego oznaczenia ilościowego badanej substancji przy wykorzystaniu odpowiedniego gazu nośnego np. azotu lub helu. Z kolei w LC, dzięki wysokiemu wskaźnikowi czułości oraz niezawodności, służy przede wszystkim do analiz metabolitów pochodzenia roślinnego [4]. Wszystkie rodzaje analiz chromatograficznych warunkują rozdzielenie poszczególnych składników próbki dzięki różnicom w ich właściwościach fizykochemicznych [5, 13, 14]. Jak już wspomniano, chromatografia gazowa oraz cieczowa łączą w sobie elementy niezbędne do analizy procesów fizjologicznych oraz biochemicznych przebiegających w roślinie. Sposób wykonania procedury zależy m.in. od rodzaju badanego materiału roślinnego, który zostaje poddany szeregowi procesów, od inaktywacji próbki po ekstrakcję, w celu uwidocznienia związków chemicznych, które w na-

stępstwie zostają poddane analizom chromatograficznym [2].

W pracy omówiono wybrane aspekty chromatografii wykorzystywanej w oznaczeniach ilościowych i jakościowych komponentów zaangażowanych w przemiany fizjologiczno-biochemiczne w roślinach.

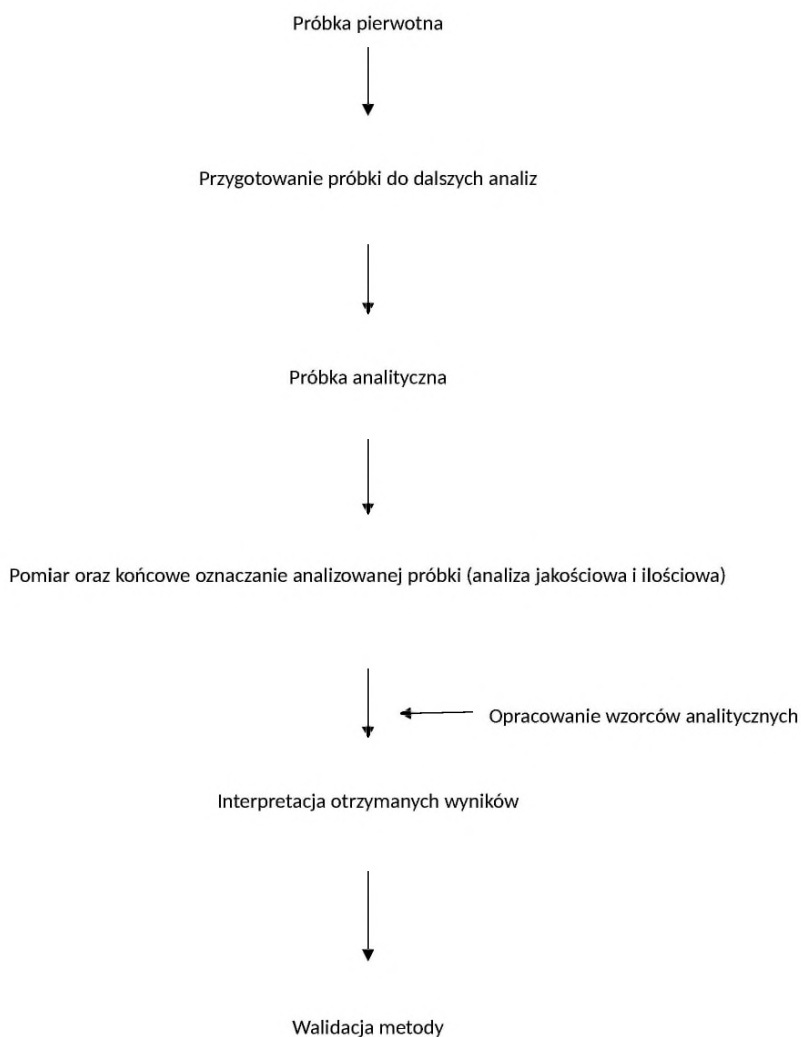
Przygotowanie próbek do analiz chromatograficznych

W pierwszej kolejności podczas przeprowadzania analiz należy pamiętać o określeniu problemu oraz potrzeb planowanych badań. Kolejnym etapem jest wybór metody, którą będziemy wykorzystywać. Dobierana ona zostaje w zależności od rodzaju próbki oraz zawartego w niej analitu. Następnie dochodzi do pobrania analizowanej próbki, jej wstępnej obróbki oraz kondycjonowania. Właściwe analizy mogą być analizami jakościowymi oraz ilościowymi i wykonywane są odpowiednio w celu przeprowadzenia prób analogicznych w porównaniu z badanym materiałem oraz przygotowania wzorców czystych, tj. bez analitu lub z jego znaną ilością. Po zakończeniu procedury analitycznej dochodzi do sprawdzenia otrzymanych wyników, oceny problemu badawczego oraz weryfikacji końcowych rezultatów (Rys. 1).

Uwzględniając występowanie substancji na poziomie śladów lub ultraśladów, należy starannie zaplanować etap przygotowywania próbek do analizy, procedurę izolacji kluczowego składnika/składników (w tym usunięcie składników interferujących) oraz wzbogacania. Właściwe przygotowanie

tego etapu zapewni polepszenie wykrywalności składnika, selektywne oddzielenie analitów od innych składników próbki, czy wprowadzenie do układu chromatograficznego czystej matrycy. W celu ograniczenia strat analitu podczas przygotowywania próbek stosuje się techniki, które łączą w sobie dwa lub więcej etapów w procedurze przygotowywania do analiz próbek, np. izolację i wzbogacanie próbki. Przykładem może być zastoso-

wanie do przygotowania próbek o charakterze ciekłym ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz; ciecz-ciało stałe, techniki Quechers, czy mikroekstrakcji do fazy stałej [13, 15]. Klejdus i in. już w 1999 roku wskazywali na efektywność zastosowania techniki HPLC poprzedzonej ekstrakcją do fazy stałej do oznaczania izoflawonoidów (daidzeiny, genisteiny, biochaniny A i biochaniny B) wyizolowanych z koniczyny łąkowej [21]. Należy zwrócić uwagę,



Rys 1. Schemat procedury analitycznej, opracowanie własne.

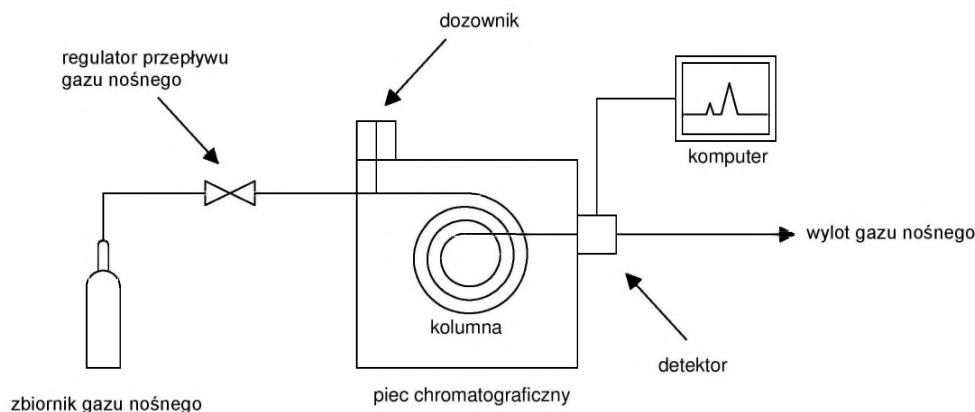
że związki analizowane przy użyciu GC muszą odznaczać się odpornością termiczną i odpowiednią lotnością. Nie znaczy to, że związki trudnolotne i nielotne nie będą analizowane tą techniką, jednak ich oznaczanie musi poprzedzić derywatyzacja (w tym przypadku przeprowadzenie związku nielotnego w bardziej lotny). Konieczność derywatyzacji badanych związków skierował zainteresowania badaczy w kierunku chromatografii cieczowej [10]. Obok derywatyzacji do popularnych metod przygotowania próbki przed analizą z wykorzystaniem chromatografii gazowej należy także estryfikacja kwasów tłuszczowych (FAME), czy ekstrakcja z fazy gazowej (nadpowierzchniowej) [12].

Oznaczanie ilościowe związane jest z koniecznością wykorzystania wzorca (standardu) wewnętrznego, który dodaje się do analizowanej próbki. Pozwala to na wyznaczenie odzysków, co ma szczególne znaczenie w analizie pozostałości pestycydów, czy metabolitów. Wzorcem wewnętrznym może być czysta forma komponentu, którego spodziewamy się w analizowanej próbce, jego izotopowe formy np. izo-flawonoidów, czy substancja o podobnej strukturze i właściwościach albo wręcz składnik niewystępujący w badanej próbce [11].

Chromatografia gazowa i przykłady jej zastosowania w analizie roślin

Chromatografia gazowa jest jedną z najczęściej stosowanych w praktyce laboratoryjnej metod, pozwalających na określenie ilościowego i jakościowego składu mieszanin. Umożliwia

szybką i dokładną analizę złożonych mieszanin o charakterze gazów lub par, a w zasadzie substancji gazowych, ciekłych i stałych, których temperatura wrzenia lub sublimacji nie przekracza 350-400°C [3, 5]. Rozwój chromatografii gazowej datuje się na 1980 r., kiedy nastąpiło gwałtowne zainteresowanie dziedzinami nauk, takimi jak medycyna, farmacja, chemia, nauki środowiskowe oraz przemysł. Zasada metody opiera się na fizycznym rozdzieleniu mieszanin na dwa zasadnicze elementy, z których jeden z nich jest fazą ruchomą, a drugi stałą (stacjonarną). Złożony proces chromatograficzny to cyklicznie powtarzane mechanizmy sorpcji oraz desorpcji, w trakcie których badany materiał przemieszcza się wzdłuż nieruchomego złoża znajdującego się w kolumnie chromatograficznej (Rys. 2). Rozdział następuje na podstawie zróżnicowanej odpowiedzi specyficznych substancji wchodzących w skład analizowanej mieszaniny na warunki rozdziału [5]. Chromatografia gazowa może być wykorzystywana do wnikliwych badań nad procesami fizjologicznymi oraz przemianami metabolicznymi roślin. Analizy metaboliczne muszą zostać poprzedzone ekstrakcją, w celu uzyskania jak największej ilości materiału poddawanego dalszym badaniom. Chromatografia gazowa najlepiej sprawdza się w badaniach lotnych metabolitów wtórnych, mono- i seskwiterpenów wchodzących w skład np. olejków eterycznych roślin, a także w analizach flawonoidów, prostych lipidów oraz alkaloidów. Jednymi z nielicznych związków, które nie mogą



Rys 2. Schemat budowy chromatografu gazowego, opracowanie własne na podstawie danych producenta zamieszczonych na stronie internetowej <https://www.thermofisher.com>.

zostać poddane analizom chromatograficznym są glikozydy, co jest spowodowane ich dużą masą oraz niskim poziomem lotności. Niestety z uwagi na konieczność derywatyzacji, tj. proces postępowania podczas analizy chemicznej doprowadzający do otrzymania pochodnej badanego związku o korzystniejszych parametrach, chromatografia gazowa jest rzadziej wykorzystywana do wykrywania flawonoidów, związków występujących naturalnie w roślinach oraz pochodnych bezno- γ -pironu (chromonu), w porównaniu do chromatografii cieczowej. Także w pracy badawczej Machowskiego [10] do analizy flawonoidów zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC, która według autora jest korzystniejsza z uwagi na obniżenie kosztów procedury badawczej oraz czasu analizy. Metoda derywatyzacji została wskazana jako wymagana w analizie hormonów roślinnych,

np. IAA [26], kwasu abscysynowego [27], czy brassinosteroidów [28].

Analiza olejków eterycznych pod kątem ich składu ilościowego i jakościowego daje najlepsze efekty przy wykorzystaniu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, poprzedzonej właściwym przygotowaniem próbki – z zastosowaniem hydrodestylacji [22]. Co więcej, chromatografię gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) zastosowano do diagnozowania jakości olejów roślinnych. W tym celu określano lotne związki będące produktami utleniania olejów roślinnych [23]. Fiehn i in. wskazali na możliwość wykorzystania GC-MS w analizie jakościowej ekstraktów metanolowych uzyskanych z liści *Arabidopsis thaliana*. W swoich badaniach wykryli ponad 300 pików odpowiadających określonym związkom, z czego zidentyfikowali tylko 30 aktywnych komponentów roślinnych, takich jak cukry (np. frukto-

za, glukoza), aminokwasy (np. lizyna, alanina), kwas nikotynowy i innych podobnych substancji mających udokumentowane znaczenie w procesach fizjologicznych roślin [29].

Chromatografia cieczowa i jej odmiany w przemianach biochemicznych i metabolizmie roślin

Chromatografia cieczowa (LC), podobnie jak gazowa, opiera się na fizycznym rozdziale składników badanej mieszaniny dzięki dwóm niemieszającym się ze sobą fazom; ruchomej, czyli eluentu, oraz stacjonarnej, którą może być rozpuszczalnik odpowiednio dopasowany do analizowanej mieszaniny. Odmianą LC jest HPLC – wysoko-sprawna chromatografia cieczowa, która została opracowana przez Horvatha w latach 60-tych XX wieku i służy do badania czystości lub identyfikacji związków chemicznych [24]. Zasadniczą różnicą między dwiema pokrewnymi odmianami chromatografii jest ciśnienie zastosowane do przepływu eluentu (faza ruchoma) przez kolumnę. Z reguły różnica ciśnień między LC a HPLC wynosi 100 atm. Zasada działania LC jest podobna do GC: próbka wstrzykiwana jest dzięki otworowi wtryskowemu do fazy ruchomej, następnie dochodzi do dostarczenia fazy ruchomej na kolumnę przez pompę wysokociśnieniową, a końcowy etap to transfer do kolumny, gdzie następuje ostateczny rozdział [7]. Jedną z najważniejszych zalet chromatografii cieczowej jest możliwość oznaczania związków polarnych i wielkocząsteczkowych, związków nielotnych o masie atomo-

wej nawet do kilku tysięcy Daltonów, polimerów i związków nieorganicznych. Ponadto analizowane są ciecze i ciała stałe, w tym związki łatwo ulegające rozkładowi termicznemu. Podstawowym warunkiem zastosowania LC jest rozpuszczalność analitów [13,14], a w przypadku związków o podobnej polarności zastosowanie wysokosprawnej (HPLC) lub ultrasprawnej (UHPLC) chromatografii cieczowej [13].

Chromatografia cieczowa znajduje zastosowanie w diagnostyce medycznej, farmacji, badaniach dotyczących bezpieczeństwa żywności, badaniach środowiskowych i podstawowych analizach biochemicznych materiału roślinnego, w tym do analizy metabolitów roślinnych [13]. Analiza metabolitów tkanek roślinnych wymaga obróbki badanych tkanek, a biorąc pod uwagę występowanie kluczowych komponentów w niewielkich ilościach i obecność ściany komórkowej utrudniającej izolację wybranych składników i ich swobodną migrację do rozpuszczalnika, próbkę homogenizuje się i poddaje działaniu ultradźwięków. W materiale roślinnym obok wysoce polarnych związków (np. sole mineralne, witaminy B i C, monosacharydy, krótkołańcuchowe aminokwasy) odnotowuje się związki niepolarne (tłuszcze i kwasy tłuszczowe, tokoferole, czy karotenoidy) [16]. Skowron i in. [16] opisali zastosowanie LC z detektorem MS do oznaczania ilościowego i jakościowego wybranych cytokinin (cis- i trans-zeatyny), ich rybozydów, kinetyny, rybozydu kinetyny i izopentenyladeniny w liściach roślin

wyższych. Dane literaturowe potwierdzają wykorzystanie LC w analizie fitohormonów roślinnych – kwasu jasmonowego, kwasu salicylowego, czy kwasu abscysynowego [17-18]. Spośród związków aktywnych w przemianach biochemicznych i fizjologicznych roślin o aktywnościach przeciwniejących, owadobójczych i przeciwbakteryjnych analizuje się flawonoidy i saponiny [10]. Pawłowski [19] prowadząc badania nad analizą ziaren słonecznika, wykorzystał technikę LC-MS/MS do identyfikacji białek, co pozwoliło na stworzenie odmian odpowiednich do uprawy pod względem zawartości olejów i plonowania. Ta sama technika pozwoliła na identyfikację białek w nasionach rzepaku ozimego związanych ze szlakami metabolicznymi [20]. Najczęściej analizowanymi związkami przy użyciu chromatografii cieczowej są prolina, gamma-amino maślan oraz poliaminy [8].

Z kolei Kucharski i Sadowski [9] w swoich badaniach wykazali zastosowanie HPLC do analizy pozostałości herbicydów takich jak fenmedifam, desmedifan oraz lenacyl. Zastosowanie HPLC do analizy pozostałości pestycydów (bezpośrednio związanych z plonowaniem roślin) pozostawała długo w cieniu GC, ale ostatecznie zdolność oznaczania związków labilnych termicznie, o niskiej lotności, czy możliwość zastosowania praktycznie nieograniczonej różnorodności wypełnień kolumn przeważyła nad zastosowaniem chromatografii cieczowej do analizy składników występujących w żywności i pestycydów [24]. Dzisiaj z zastosowaniem HPLC i różnych de-

tektorów analizuje się pestycydy z grupy syntetycznych pyretroidów, karbaminianów, pochodnych fenylo-mocznika, triazyn, pochodnych benzimidazolu [25].

Podsumowanie

Istnieje wiele metod, które umożliwiają precyzyjną identyfikację i określenie intensywności procesów biochemicznych oraz zaangażowanych w nie składników/biokomponentów charakterystycznych dla roślin. Jednak to techniki chromatograficzne stały się nieodzownym elementem pracy laboratorium środowiskowego, przyrodniczego, czy diagnostyki medycznej. Wykorzystywane są głównie pod kątem oznaczeń analitycznych, lecz także coraz częściej preparatywnych lub procesowych. Ich głównym atutem jest zdolność do rozdzielania wieloskładnikowych substancji posiadających takie same, lub bardzo podobne właściwości. Aktualny stan wiedzy pozwala na możliwie duże wykorzystanie potencjału chromatografii gazowej oraz cieczowej. Techniki chromatograficzne, dzięki szerokim możliwościom wykrywania analizowanej substancji oraz oznaczania jej nawet gdy występuje w minimalnych ilościach w obecności szeregu innych nieoznaczonych substancji, stały się jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w biotechnologii. Reasumując, GC oraz HPLC najczęściej stosowane są do jakościowej oraz ilościowej analizy mieszanin związków organicznych i nieorganicznych; w procesach takich jak kontrola zanieczyszczeń środowiska lub kontrola

procesów przemysłowych. Ponadto są nieodzownym elementem badań fizykochemicznych oraz badań strukturalnych związków organicznych

występujących w roślinach, pozwalając na śledzenie przebiegu procesów metabolicznych i ich wpływu na wzrost i rozwój roślin.

Bibliografia:

- [1] Profiling Methods to Identify Cold-Regulated Primary Metabolites Using Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry, red. Dirk K. Hinch, E. Zuther., Springer New York, New York, 2014, str. 171-172.
- [2] Khoddami A., Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds, *Molecules*, 2013, 18(2), 2328-2375.
- [3] Lisec J., Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants, *Nature*, 2006, 387-396.
- [4] Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary, Gas Chromatography, red. W. Jennings, Academic Press, A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, 1980, str. 5-11, str. 15-16.
- [5] Chromatography Today, red. C.F. Poole, S.K. Poole., Elsevier Science Publishers B.V., New York, 1991, str. 1-6.
- [7] Liquid Chromatography: Mass Spectrometry, Second Edition, red. Wilfried M.A. Niessen, Marcel Dekker, New York, 1999, str. 125-136.
- [8] Obata T., Fernie A.R., The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 69(19), 3225-3243.
- [9] Kucharski M., Sadowski J., Herbicide residues in sugar beet roots., *Progress In Plant Protection*, 2014, 54(1), 6-7.
- [10] Machowski M., Kaliszewska D., Kiss A., Chromatograficzne metody izolacji i identyfikacji flawonoidów i saponin, *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2010, 4, 27-37.
- [11] Kaniewska J., Przegląd metod oznaczania izoflawonoidów, 2012, *Inżynieria Przetwórstwa Spożywczego*, 4(4), 25-30.
- [12] Snow N.H., Snack G.C., Head-space analysis on modern gas chromatography, *Trends Anal. Chem.*, 2002, 21(9+10), 608-617.
- [13] Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych, Z. Witkiewicz, J. Kałużna, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa, 2012, str. 167-169
- [14] Chemia analityczna. Chromatografia cz. I-III, K. Hierasimczyk, W. Wardencki, J. Namieśnik, Wydawnictwo Wydziału Chemii, Politechnika Gdańska, 2002, str. 1-19, 1-23, 1-15
- [15] Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy, J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, M. Pilarczyk, L. Torres, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa, 2000, str. 3-128.
- [16] Skowron M., Grabowska-Polanowska B., Waligórski P., Faber J., Śliwka I., Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), jako przykład techniki łączonej – podstawy teoretyczne i przykłady zastosowania, Raport Nr 2089/Ch, Kraków, 2016, str. 1-44.
- [17] Koojima K., Characteristics of HPLC columns and mass spectra of LC-MS for phytohormone analysis, *JARQ*, 2001, 35(3), 149-154.
- [18] Yu J., Meng Q., Liu E., Lu Y., Ren X., Analysis of acidic endogenous

phytohormones in grapes by using online SPE extraction coupled with LC-MS/MS, *Journal of Chromatographic Science*, 2013, 7, 1-5.

[19] Pawłowski T., *Proteomika nasion*, *Biotechnologia*, 2009, 1(84), 104-118.

[20] Hajduch M., Casteel J.E., Hurrelmeyer K.E., Song Z., Agrawal G.K., Thelen J.J., Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus*. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis, *Plant Physiology*, 2006, 141(1), 32-46.

[21] Klejdus B., Vitamvasova D., Kuban V., Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 1999, 839(1-2), 261-263.

[22] Kwaśny J., Vogt O., Lason E., Analiza instrumentalna kompozycji olejków eterycznych z roślin baldaszkowatych (*Apiaceae*) na przykładzie olejku anyżowego, 2012, *Chemia. Czasopismo Techniczne*, 16(109), 71-83.

[23] Gromadzka J., Wardencki W., Opracowanie procedury oznaczania lotnych produktów utlenienia olejów roślinnych techniką statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej, 2009, 30, 103-117.

[24] Jędrzejczuk A., Góralczyk K., Czaja K., Struciński P., Ludwicki J.K.,

Wysokosprawna chromatografia cieczowa – jej zastosowanie w analizie pozostałości pestycydów, *Roczniki PZH*, 2001, 52(2), 127-138.

[25] Kryteria Zdrowotne Środowiska. Tom 78. Pestycydy ditiokarbaminianowe, etylenotiomocznik i propylenotiomocznik. Wprowadzenie ogólne, Instytut Medycyny Pracy, Łódź, 1994.

[26] Edlund A., Eklof S., Sundberg B., Moritz T., Sandberg G., A microscale technique for gas chromatography-mass spectrometry measurements of picogram amounts of indole-3-acetic acid in plant tissues, *Plant Physiology*, 1995, 108, 1043-1047.

[27] Duffield P.H., Netting A.G., Methods for the quantitation of abscisic acid and its precursors from plant tissues, *Anal. Biochem.*, 2001, 289, 251-259.

[28] Shimada Y., Goad H., Nakaumra A., Takatsuto S., Fujioka S., Yoshida S., Organ-specific expression of brassinostereoid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 2003, 131, 287-297.

[29] Fiehn O., Kopka J., Trethewey R.N., Willmitzer L., Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental composition using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 3573-3580.